

肿节风药材 HPLC 指纹图谱研究

宋晓虹¹, 李小艳¹, 李成仁¹, 韦琪生², 黄冠霖², 蒋林³, 叶创兴^{1*}

¹中山大学生命科学学院, 广州 510275; ²东兰县科技局, 河池 547460;

³中山大学药学院, 广州 510006

摘要:采用反相高效液相色谱法建立了肿节风药材的指纹图谱, 色谱柱为 Hypersil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以乙腈-0.1%磷酸水溶液为流动相进行二元梯度洗脱, 流速 1.0 mL/min, 柱温 35℃, 检测波长 300 nm。对 10 批不同产地的肿节风药材进行了检测, 并应用“中药色谱指纹图谱相似度评价软件”生成了共有模式色谱图, 共有 16 个色谱峰, 各色谱峰分离情况良好。精密度、重复性和稳定性试验中各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3%, 符合指纹图谱要求。该方法简便、可靠, 精密度、稳定性和重复性良好, 可用于肿节风药材的质量评价。用该方法比较了肿节风药材不同部位指纹图谱的差异, 为最佳用药部位的确定提供了理论依据。

关键词:肿节风; 高效液相色谱法; 指纹图谱

中图分类号: R284.2; Q946.91

文献标识码: A

Fingerprint of *Sarcandra glabra* Established by HPLC

SONG Xiao-hong¹, LI Xiao-yan¹, LI Cheng-ren¹, WEI Qi-sheng²,
HUANG Guan-lin², JIANG Lin³, YE Chuang-xing^{1*}

¹School of Life Science, Sun-Yat Sen University, Guangzhou 510275, China;

²Bureau of Science and Technology of Donglan County, Hechi 547460, China;

³School of Pharmaceutical Science, Sun-Yat Sen University, Guangzhou 510006, China

Abstract: The fingerprint of *Sarcandra glabra* was established by RP-HPLC. It was completed on Hypersil C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with acetonitrile-0.1% phosphoric acid as mobile phase in gradient. The flow rate was 1.0 mL/min, and the column temperature was 35℃. The detecting wavelength was set at 300 nm. Ten samples of *S. glabra* collected from different areas were detected and the standard fingerprint of *S. glabra* was originated from the "Computer Aided Similarity Evaluation" software, 16 common peaks existed in the fingerprint and each peak was separated well. The RSD of precision, repeatability and stability of all measurement were less than 3%. This method can be used to evaluate the quality of *S. glabra*. The fingerprint of different parts of *S. glabra* was compared in order to determine which part to use.

Key words: *Sarcandra glabra*; HPLC; fingerprint

肿节风为金粟兰科植物 (Chloranthaceae) 草珊瑚 (*Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai) 的全草, 又名九节茶、接骨木等, 主要分布于我国华南、华东、西南各省区。肿节风全株用药, 其性味辛、平, 有抗菌消炎、祛风除湿、活血止痛等功效, 用于治疗肺炎、急性阑尾炎、菌痢、风湿疼痛、跌打损伤、骨折等症^[1]。中国药典^[2]通过 HPLC 法测定其中异嗪皮啶的含量

来对肿节风药材的质量进行控制。王砚等^[3]采用同时测定异嗪皮啶和反丁烯二酸含量的方法控制肿节风药材的质量。由于受产地、生态环境等因素影响, 肿节风药材中有效成分的含量会有显著差异, 且中药药效是多种活性成分的协同作用结果, 指纹图谱能够反映中药材尽量多的组分, 对药材的质量控制具有整体性, 目前已被广泛用于中药材质量控制。本文研究并建立了肿节风药材的高效液相色谱指纹图谱, 并对比了不同产地肿节风药材和肿节风药材不同部位化学成分的差异, 为肿节风药材的质量控制和最佳用药部位的确定提供了理论依据。

收稿日期: 2007-10-19 接受日期: 2008-03-31

基金项目: 广西河池东兰县政府委托项目

*通讯作者 Tel: 86-20-87333159; E-mail: lssycx@mail.sysu.edu.cn

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Waters 515 高效液相色谱仪 (二元泵, 2487 紫外检测器, 柱温箱, 广州逸海色谱工作站); Hypersil C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 国家药典委员会推荐“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”软件 (2004 版)。

反丁烯二酸 (批号: 152326-200408) 和异嗪皮啶 (批号: 110837-200304) 对照品购于中国药品生物制品检定所, 纯度大于 98%。乙腈、磷酸为色谱纯 (Merck 公司), 超纯水, 其余试剂均为分析纯。

10 批不同产地的肿节风药材 (表 1), 均由中山大学生命科学学院叶创兴教授鉴定为金粟兰科植物草珊瑚 *S. glabra* 的全草。

表 1 10 批肿节风样品的产地及采集时间

Table 1 Source of 10 *S. glabra* samples

样品 No	产地 Origin	时间 Time
1 ^a	四川	2006. 12
2 ^b	广西 GAP 基地	2007. 3
3 ^c	广东肇庆	2006. 10
4 ^b	广东广州	2006. 10
5 ^c	广西河池	2007. 1
6 ^c	广西河池	2007. 3
7 ^a	广东清远	2006. 11
8 ^c	广西昭平	2007. 1
9 ^c	云南屏边	2006. 10
10 ^b	江西新干	2007. 3

注: ^a 购买, ^b 栽培, ^c 野生。

1.2 色谱条件与系统适应性

色谱柱为 Hypersil C₁₈ 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.1% 磷酸水溶液, 梯度洗脱程序: 0~8 min, 乙腈 5%; 8~40 min, 乙腈 5%~8%; 40~70 min, 乙腈 8%~14%; 70~130 min, 乙腈 14%~16%; 130~140 min, 乙腈 16%。流速为 1.0 mL/min, 柱温为 35, 检测波长为 300 nm。理论塔板数以异嗪皮啶计不低于 7000。

1.3 对照品溶液及供试品溶液的制备

精密称取干燥恒重的异嗪皮啶和反丁烯二酸对照品 3.2 和 10.0 mg, 置于 10 mL 容量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀即得浓度分别为 0.32 和 1.0 mg/mL 的异嗪皮啶和反丁烯二酸对照品溶液。

精密称取不同产地的肿节风药材全株或药材不同部位的干燥粉末 1.0 g, 置于 100 mL 圆底烧瓶中, 加入 70% 乙醇水溶液 40 mL, 回流提取 1 h, 提取 2 次, 合并提取液, 浓缩后用 0.1% 磷酸水溶液定容至 25 mL, 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 滤液供 HPLC 分析。

1.4 样品的测定

分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 20 μL, 注入高效液相色谱仪, 记录 140 min 的色谱图, 即得。

1.5 数据处理

将 10 批不同产地样品的液相色谱图导入国家药典委员会推荐的 2004A 版“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”软件, 得到肿节风药材的共有模式色谱图, 计算出每批样品的色谱图与共有模式色谱图的相似度。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件及提取方法的优化

吴永江等^[4]曾对肿节风药材的指纹图谱进行了研究, 所采用的检测波长为 340 nm, 此波长条件下, 所得到的色谱图峰信息较少, 而且不能检测到有效成分反丁烯二酸, 同时该色谱条件未能对保留时间较短的成分进行分离。王钢力等^[5]对肿节风注射液的指纹图谱进行了研究, 所采用的检测波长为 220 nm, 由于其研究目标为肿节风注射液, 与肿节风药材相比, 注射液中化学成分明显减少, 该色谱条件不适用于不同产地肿节风药材指纹图谱测定。本研究经过反复试验建立了肿节风药材的指纹图谱条件, 在该色谱条件下, 肿节风药材中有效成分反丁烯二酸吸收较强, 色谱信息最多, 不同极性色谱峰得到了基线分离。

2.1.1 流动相的选择

分别比较了以下溶剂系统: (1) 甲醇-水溶液; (2) 甲醇-0.1% 磷酸水溶液; (3) 乙腈-1% 醋酸水溶液; (4) 乙腈-0.1% 磷酸水溶液; (5) 乙腈-0.1 M 磷酸盐缓冲液。经对比发现以乙腈-0.1% 磷酸水溶液进行梯度洗脱时, 不同极性组分分离效果良好, 而其它溶剂系统对大极性组分分离效果较差, 影响反丁烯二酸的检出。

2.1.2 检测波长的选择

反丁烯二酸在 210 nm 处有最大吸收, 异嗪皮啶在 210 和 340 nm 下吸收较强, 为了能同时检测到反丁烯二酸和异嗪皮啶, 并得到较多的峰信息和较好

的分离效果,选择了如下几个波长进行试验:230、254、280、300、340 nm。发现在300 nm时异嗪皮啶和反丁烯二酸吸收较强,基线漂移小,各色谱峰的高度合适,分离效果好,且能得到较多的峰信息。

2.1.3 参照物的选择

异嗪皮啶为肿节风主要有效成分,因此选择其作为参照物。

2.1.4 提取溶剂和提取方式的比较

分别采用水超声、水煎煮、70%乙醇溶液回流3种方法对肿节风药材进行了提取,并按上述色谱条件进行分析,以样品中异嗪皮啶和反丁烯二酸的含量为指标,以峰容量为参考,筛选指纹图谱研究的最佳提取条件。结果表明,不同的提取方法,峰容量相同,但70%乙醇回流提取各色谱峰含量较高,故选择70%乙醇溶液作为提取溶剂。

2.2 方法学考察

2.2.1 精密度试验

精密吸取肿节风样品(Na₂)溶液20 μL,重复进样6次,记录色谱图。结果表明,各主要色谱峰与异嗪皮啶色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的RSD分别在0.4029%~2.3978%和1.0296%~3.6705%之间,符合指纹图谱分析要求。

2.2.2 稳定性试验

精密吸取肿节风样品(Na₂)溶液20 μL,分别在0、2、4、8、12和24 h进样,计算各主要色谱峰与异嗪皮啶色谱峰的相对保留时间和相对峰面积。结果表明,各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积较稳定,RSD分别在0.4029%~2.5824%和1.1000%~2.984%之间,表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.2.3 重现性试验

取肿节风样品(Na₂)6份,按供试品溶液的制备方法,分别制成供试品溶液进行测定。结果表明,各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的RSD分别在0.4385%~3.3840%和1.3202%~3.0475%之间,表明该方法的重复性良好。

2.3 肿节风药材指纹图谱的建立

2.3.1 色谱图共有模式的建立和共有色谱峰的确

通过对10批不同产地肿节风药材进行测定,并将其导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”进行数据处理,建立了肿节风药材的共有模式色谱图,并确定了16个共有色谱峰,如图1所示。采用加入法定性试验,确定了其中的1号峰为反丁烯二酸,13

号峰为异嗪皮啶,如图2所示。

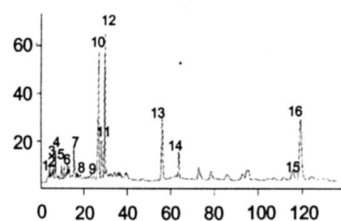


图1 肿节风药材共有模式指纹图谱

Fig. 1 Standard HPLC fingerprint graphic of *Sarcandra glabra*

1. 反丁烯二酸 Fumaric acid; 13. 异嗪皮啶 Isofraxidin

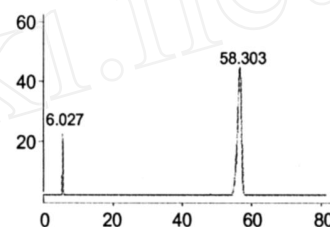


图2 反丁烯二酸和异嗪皮啶的 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatography of fumaric acid and isofraxidin

6.027 min 为反丁烯二酸; 58.303 min 为异嗪皮啶

Peak of 6.027 min is Fumaric acid; Peak of 58.303 min is Isofraxidin

2.3.2 不同产地肿节风药材指纹图谱相似度评价

利用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”,将不同产地肿节风药材的指纹图谱与对肿节风药材的共有模式色谱图进行对比,得出各色谱图的相似度。10批药材的相似度介于0.758和0.895之间,如图3和表2所示。从色谱图中可以看出,各产地样品中均含有异嗪皮啶,而且含量相似,但是各产地肿节风药材相似度稍低,说明各产地地理和气候环境对肿节风药材化学成分的组成和含量存在一定影响。各产地肿节风药材色谱图的主要不同有两处,一是保留时间处于25~35 min的色谱峰,各样品三个共有峰的峰面积差别较大,另外,广西河池不同时间采集的两批样品中70~120 min有6个明显的色谱峰,而且峰面积较大,其它产地色谱图中此保留时间段6个色谱峰的峰面积较小或缺失,色谱图中这两处的差别对各产地样品色谱图的相似度影响较大。关于广西河池样品色谱图中70~120 min的色谱峰所代表的成分及其对肿节风药效的贡献有待于进一步研究。

2.3.3 肿节风药材不同部位指纹图谱分析

将于2007年3月采集的广西GAP基地肿节风药材的根、茎、叶、全草、地上部分等5个部分进行了

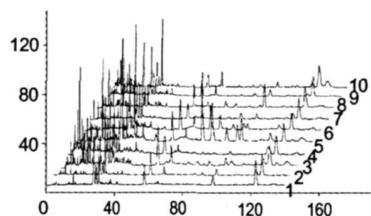


图 3 不同产地肿节风药材指纹图谱

Fig. 3 Fingerprint graphs of *S. glabra* from different habitats
1. 四川 (2006. 12); 2. 广西河池 GAP基地 (2007. 03); 3. 广东肇庆 (2006. 10); 4. 广东广州 (2006. 10); 5. 广西河池 (2007. 01); 6. 广西河池 (2007. 03); 7. 广东清远 (2006. 11); 8. 广西昭平 (2007. 01); 9. 云南屏边 (2006. 10); 10. 江西新干 (2007. 3)

指纹图谱分析,结果见图 4,由图中可以看出,肿节风根、茎、叶各部位均含有有效成分异嗪皮啶,三个部位的指纹图谱差异较大,主要表现 15 号和 16 号共有峰的峰面积大小有所不同,根和茎的色谱图中只有 16 号色谱峰,不含有 15 号色谱峰,叶的色谱图中同时含有 15 号色谱峰和 16 号色谱峰,说明 15 号

表 2 不同产地肿节风药材的相似度

Table 2 Similarity of 10 samples of *Sarcandra glabra*

样品 No	产地 Origin	相似度 Similarity
1	四川	0.864
2	广西河池 GAP基地	0.895
3	广东肇庆	0.758
4	广东广州	0.654
5	广西河池	0.680
6	广西河池	0.820
7	广东清远	0.815
8	广西昭平	0.785
9	云南屏边	0.851
10	江西新干	0.830

色谱峰所代表的化学成分只存在于肿节风的叶中。地上部分与全株指纹图谱的相似程度较高,表明二者化学成分组成差别不大。

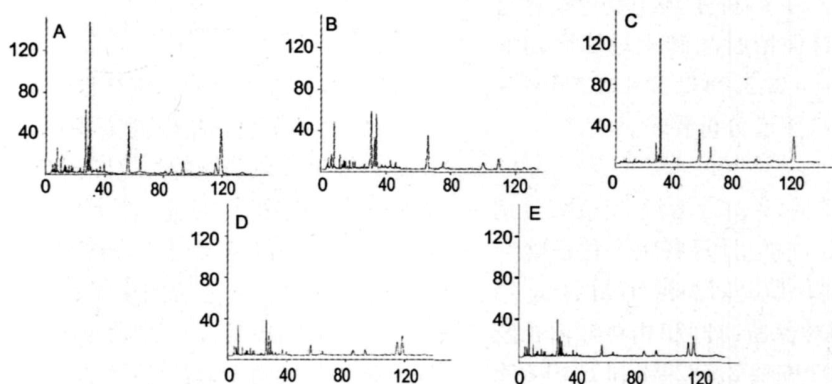


图 4 肿节风药材不同部位指纹图谱 (样品 2)

Fig. 4 Fingerprint graphs of different parts of *S. glabra* (No. 2)

A. 全株 The whole plants; B. 地上部分 Overground parts; C. 根 Roots; D. 茎 Stems; E. 叶 Leaves

3 结论

本研究采用 HPLC 法建立了肿节风的指纹图谱分析方法,该方法稳定、可靠,重现性好,可通过指纹图谱整体图形、共有特征峰、相对保留时间等参数对药材进行鉴定,通过各共有峰相对峰面积可对药材的内在质量进行评价。由于自然条件的变化,不同产地的肿节风,差异很大,相似度较小,说明药材应在固定产地的前提下才能保证药品内在质量的一致性,否则,如将来源各异的药材混批生产,会直接影响成品化学成分及指纹图谱的稳定性,从而影响药

品的质量。

致谢:本项目的研究自始至终得到东兰县政府的大力支持,项目的顺利实施过程和协作单位东兰县科技局包括韦健副局长等的鼎力支持是分不开的。

参考文献

1. Jiangsu New Medical College (江苏新医学院). Dictionary of Chinese Materia Medica (中药大辞典). Shanghai: Shanghai Science and Technology Publishing House, 1986. 42-43.

(下转第 151 页)

验证实验,结果表明了笋壳黄酮的抗氧化能力大于标品的芦丁,因此,本实验进行的笋壳黄酮的提取具有实际生产上的意义。

4 结论

综上所述,文中以竹笋壳为原料进行黄酮提取工艺及黄酮类化合物并通过对油脂抗氧化性的验证,表明用超声波辅助萃取方法提取该类原材料总黄酮的理想条件,即萃取时间 40 min,萃取温度 65℃、料液比 1:25、超声波功率 240 W。抗氧化性实验结果表明,芦丁和笋壳黄酮都具有较明显的抗氧化作用且笋壳黄酮的抗氧化活性要高于合成的抗氧化剂芦丁,同时黄酮类化合物的抗氧化性与剂量成正比关系。所采用方法为全物理过程,无任何污染,是一条理想的提取黄酮类物质的途径,具有应用前景;其笋壳中含有较为丰富的黄酮,能为竹笋加工后的废弃物进一步应用于生产实践,对减轻环境污染、促进经济再利用具有重要意义。

参考文献

- 1 Wang F(王芳), Li JR(励建荣), Jiang YM(蒋跃明). Extraction, purification and anti-oxidation evaluation of flavonoids from *Monis alba* L. leaves *J Chin Cereals And Oil Association* (中国粮油学报), 2006, 21: 106-111.
- 2 Chen ND(陈乃动), Gu SB(固守标), Wang CJ(王春景), et al Study on flavonoids extraction and function of scavenging hydroxy free radical from *Lespeda dunnii* *Food Sci*(食品科学), 2007, 28(1): 86-90.
- 3 Li SH(李胜华), Wu XJ(伍贤进), Yu JP(郁建平), et al Study on extraction process of flavonoids from *Houtuynia condata* Thmb leaves with supersonic extraction *Food Sci*(食品科学), 2007, 27(12): 270-273.
- 4 Zhang LY(张凌云). The application and study of flavone in bamboo leaf moderm *Food Sci Tech* (现代食品科技), 2006, 22(2): 247-249.
- 5 GB/T 5009·37-1996 Analysis of Hygienic Standards for Edible Oil(食用植物油卫生标准的分析方法).
- 6 Li HY(李洪玉), Sun JY(孙静芸), Dai SW(戴诗文). Studies on the productive technology of flavonoids extract from the leaves of *Phyllostachys pubescens* *Chin J Modem Applied Pham* (中国现代应用药学), 2004, 21: 371-372.
- 7 Zhu HL(朱宏莉), Wei HH(韦海洪), et al Study on extraction and purification of total flavones from bamboo leaves *Food Sci*(食品科学), 2005, 28(6): 158-161.
- 8 Weng XC(翁新楚). Oxidative of lipid in air *J Chin Cereals Oil Association* (中国粮油学报), 1993, 7(3): 22-28.
- 9 Zhao XH(赵喜红), He XW(何小维), Luo ZG(罗志刚), et al Study on the ethanol extraction conditions and antioxidant property of flavonoids from leaves of *Diospyros kaki* *Food Res Dev*(食品研究与开发), 2007, 28(3): 49-53.
- 10 Lu YH(卢艳华). Technology of Extraction and Separation by TCD 'Sactive Ingredient(中药有效成分提取与分离技术). Beijing: Chemistry Industry Publishing House, 2005. 122-124.
- 11 Song XK(宋晓凯). Chemical of Natural Drug(天然药物化学). Beijing: Chemistry Industry Publishing House, 2005. 81-82.
- 12 Zhang Y(张英), Wu XQ(吴晓琴). Study on change rual of flavone and lacton from bamboo leave *Chem and Indus Forest Prod* (林产化学与研究), 2002, 22(2): 65-69.
- 13 Peng AH(彭爱红), Ye P(叶鹏), Chen SY(陈素艳), et al Study on ultrasonic extraction conditions of edible cactus flavones and its antioxidative activity. *Food Sci*(食品科学), 2006, 27(12): 527-530.
- 14 Li XX(李秀信), Wang RH(王荣华), Li P(李萍). Flavonoids from kabpanax leaves: extraction and antioxidation evaluation. *J Chin Cereals Oil Association* (中国粮油学报), 2006, 21: 167-169.

(上接第 114页)

- 2 State Pharmacopocia Committee of China(国家药典委员会). Pharmacopoeia of the Peple 's Republic of China, Part (中华人民共和国药典,一部). Beijing: Chemical Industry Press, 2005. 154-155.
- 3 Wang Y(王砚), Wang GL(王钢力), Yao LW(姚令文), et al Detemination of fumaric acid and isofraxidin in *Sarandra glabra* (Thunb.) Nakai West *Chin J Pham Sci*(华西药学杂志), 2005, 20: 60-62.
- 4 Wu YJ(吴永江), Hou XR(侯晓蓉), Cheng YY(程翼宇). Fingerprint study of *Sarandra glabra* by HPLC. *Chin J Chin Mat Med*(中国中药杂志), 2005, 30: 67-69.
- 5 Wang GL(王钢力), Zheng XW(郑笑为), Chen DF(陈道峰), et al Fingerprint of *Sarandra glabra* injection by HPLC. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2004, 35: 1119-1123.